

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000284

International filing date: 09 February 2005 (09.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0401282
Filing date: 10 February 2004 (10.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 15 April 2005 (15.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



PCT/FR 20 05 / 0 0 0 2 8 4

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 FEV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



REMISE DES PIÈCES DATE LIEU 10 FEV 2004 N° D'ENREGISTREMENT 31 INPI TOULOUSE NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0401282 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 10 FEV. 2004		Réservé à l'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet BARRE LAFORGUE & associés 95 rue des Amidonniers 31000 TOULOUSE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) UN643BF10626 K21					
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes			
Demande de brevet Demande de certificat d'utilité		<input checked="" type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		<input type="checkbox"/>			
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>			
		N°		Date	
		N°		Date	
		N°		Date	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MODULATEURS DE DEVELOPPEMENT DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES, ET APPLICATIONS.					
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique			
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF		UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III Etablissement à caractère scientifique, culturel et professionnel <input type="text"/>			
Domicile ou siège		118 route de Narbonne 31062 TOULOUSE CEDEX 4			
Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		FRANCE Française N° de télécopie (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»					

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

10 FEV 2004

31 INPI TOULOUSE

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0401282

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE <i>(s'il y a lieu)</i>	
Nom	
Prénom	
Cabinet ou Société	Cabinet BARRE LAFORGUE & associés
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	
Adresse	Rue 95 rue des Amidonniers
	Code postal et ville 31000 TOULOUSE
	Pays FRANCE
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>	05 61 21 08 67
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	05 61 22 79 23
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>	
7 INVENTEUR (S)	
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE	
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES	
Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence)</i> : AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS	
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint	<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE <i>(Nom et qualité du signataire)</i>	
Christian LASSIAILLE CPI N° 92.1137	DE MANDATAIRE CABINET BARRE LAFORGUE & associés PROFESSEUR INDUSTRIEL EN FRANCE ET A L'ÉTRANGER 95, rue des amidonniers 31000 TOULOUSE
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1. / 1.

BR/SUITE

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

10 FEV 2004

31 INPI TOULOUSE

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0401282

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 W / 010702

Vos références pour ce dossier *(facultatif)*

UN643BF10626 K21

**4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE**

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom
ou dénomination sociale

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)

Prénoms

Forme juridique

Etablissement public doté de la personnalité civile

N° SIREN

et de l'autonomie financière

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

3 rue Michel-Ange

Code postal et ville

75016 PARIS

Pays

FRANCE

Nationalité

Française

N° de téléphone *(facultatif)*

N° de télécopie *(facultatif)*

Adresse électronique *(facultatif)*

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☐ **Personne morale**

☐ **Personne physique**

Nom
ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile
ou
siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone *(facultatif)*

N° de télécopie *(facultatif)*

Adresse électronique *(facultatif)*

LE MANDATAIRE

CABINET
BARRÉ-LAFORGNE
& associés

VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

**11 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)
Christian LASSIAILLE
CPI N° 92.1137

PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE EN FRANCE ET À L'ÉTRANGER
95, rue des Capucinières 91000 EVRY-COURCOURONNES

MODULATEURS DE DEVELOPPEMENT
DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES,
ET APPLICATIONS

5 L'invention concerne la culture des végétaux terrestres et celle des champignons mycorhiziens à arbuscules. Elle vise plus particulièrement les techniques utilisées pour stimuler la croissance et le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules et/ou pour stimuler la mycorhization et le développement des plantes d'intérêt agronomique et/ou forestier.

10 Bon nombre de plantes terrestres, dès le stade juvénile, vivent en symbiose avec des micro-organismes qui leur sont associés au niveau des racines. Parmi ces micro-organismes, les champignons mycorhiziens à arbuscules (champignons MA), aussi désignés "champignons vésiculaires et arbusculaires" (champignons VAM), établissent avec certaines plantes, dites
15 plantes hôtes, une interaction intime assurant le fonctionnement mutualiste de la symbiose. L'établissement d'une telle symbiose entre une plante et les champignons mycorhiziens est appelé mycorhization.

Les champignons MA font parti d'un groupe de champignons archaïques, les Glomeromycota, dont les ancêtres seraient à
20 l'origine des groupes modernes Ascomycota et Basidiomycota (Schussler et *al.*, Mycological Research, 2001, 105:1413-1421).

Sûrement présents lors de l'apparition des premiers végétaux terrestres, les ancêtres des Glomeromycota auraient contribué à l'acclimatation des végétaux au milieu terrestre, assurant aux plantes un apport en
25 eau et en sels minéraux plus efficace. Par co-évolution (bio-radiations évolutives), les champignons MA auraient acquis au cours de l'évolution l'aptitude à interagir avec un nombre croissant de plantes, dites plantes hôtes. On estime actuellement que plus de 80 % des espèces végétales terrestres sont associées aux champignons mycorhiziens à arbuscules, parmi lesquelles, des
30 espèces herbacées d'intérêt économique majeur (aussi bien des espèces

céréalières, fruitières que potagères), mais aussi des espèces ligneuses (ornementales, forestières et fruitières).

Au niveau du champignon, cette interaction se manifeste par l'apparition de structures filamenteuses, appelées hyphes, qui se propagent en tout un réseau dans le sol. L'ensemble des hyphes du champignon forme le mycélium qui correspond à la structure assimilatrice du champignon.

Simultanément, le champignon se développe aussi dans les racines de la plante hôte. Il existe donc un continuum fongique entre le sol et les tissus racinaires. Grâce au réseau mycélien extraracinaire du champignon, la plante hôte dispose d'un plus grand volume d'exploration du sol pour s'approvisionner en eau et sels minéraux. Outre l'amélioration de l'apport hydrique et minéral dont profite la plante hôte, cette association symbiotique améliorerait également sa résistance aux pathologies racinaires.

Cette alliance fonctionnelle est également bénéfique pour les champignons MA qui ne peuvent vivre qu'en association avec des racines dont ils dépendent pour leur apport en substrats carbonés. Ainsi physiquement et fonctionnellement associés à la plante hôte, ces micro-organismes se multiplient dans le sol par dissémination de propagules (spores et/ou mycélium).

Depuis quelques années, on a tenté de mettre au point des techniques de symbiose dirigée permettant d'intensifier l'interaction bénéfique entre les champignons MA et de nombreuses espèces végétales cultivées, agricoles et forestières, de façon à améliorer l'apport hydrique et minéral de ces plantes hôtes, ainsi que leur résistance aux maladies racinaires. Ces techniques de symbiose dirigée ouvriront des perspectives prometteuses pour le développement de pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement.

En particulier, l'épandage de champignons MA sur les sols de culture optimiserait leur teneur en ces micro-organismes bénéfiques pour la plante à cultiver, et permettrait par conséquent de réduire sensiblement les quantités d'engrais, notamment chimiques, ordinairement employés pour enrichir les sols, en particulier les phosphates et les nitrates qui contribuent en grande partie à la pollution des nappes phréatiques.

Toutefois, pour qu'un tel concept puisse s'appliquer aux grandes cultures, il faudrait pouvoir disposer d'une quantité importante de ces champignons MA, et de préférence sous forme de spores, plus faciles à manipuler et à stocker. Mais à l'heure actuelle, on ne connaît malheureusement
5 aucune méthode capable de produire des spores de champignons MA en quantité suffisante pour une telle application.

De nombreuses techniques ont pourtant été proposées pour améliorer le développement et la croissance des champignons MA, notamment pour amplifier leur sporulation. Généralement basées sur une co-culture du
10 champignon en présence d'une plante hôte entière en pot, ou *in vitro* en présence seulement de racines cultivées, ces techniques n'ont jusqu'à présent donné lieu qu'à des productions de propagules en quantités relativement faibles, insuffisantes pour une application agronomique à grande échelle.

La supplémentation du milieu de co-culture en exsudats racinaires, réputés être stimulateurs du développement des champignons MA, a
15 également été envisagée. Malheureusement, là encore, on ne dispose d'aucune méthode d'obtention de ces stimulateurs autre que la récupération "passive" et lente des exsudats produits et sécrétés progressivement par les racines des plantes, et en quantités seulement suffisantes pour l'expérimentation en
20 laboratoire.

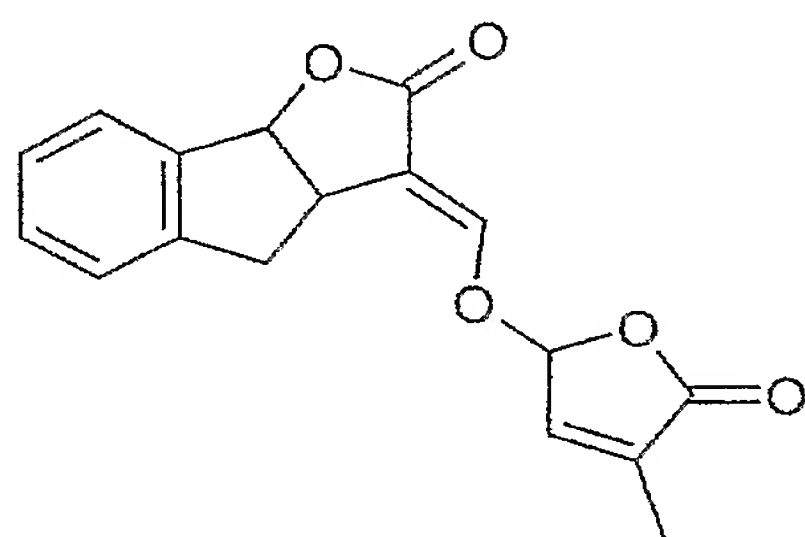
Dans ce contexte, l'invention tente de remédier à la très faible disponibilité des spores de champignons MA ainsi qu'à celle des stimulateurs du développement de ces micro-organismes. A cet effet, l'invention vise en premier lieu à proposer de nouveaux facteurs de stimulation du
25 développement et/ou de la croissance des champignons MA. L'invention a également pour principal objectif de proposer de tels facteurs de stimulation dont la disponibilité et l'accessibilité de certains d'entre eux ne constituent pas une limite quant à leur application à grande échelle, c'est-à-dire une application qui va au-delà de celle des paillasse de laboratoire ou d'une simple culture sous-
30 serre.

En particulier, l'invention a pour intérêt d'améliorer la productivité des méthodes d'obtention, notamment à l'échelle industrielle, d'inoculum de champignons MA.

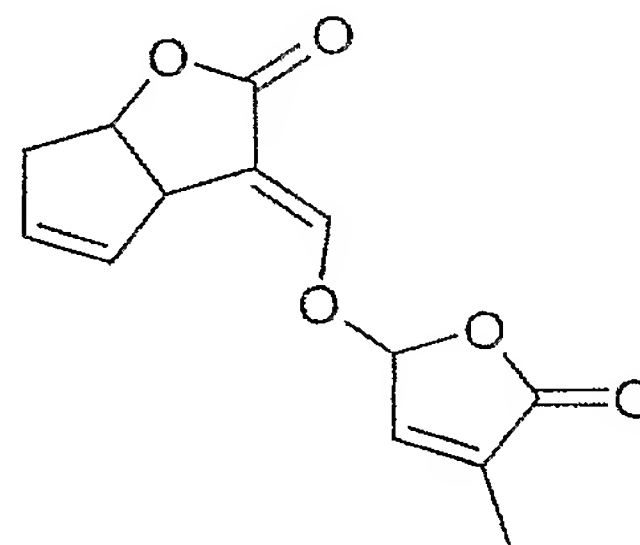
Dans tout le texte, par "inoculum", on entend toute forme de champignon MA susceptible de coloniser une plante hôte : spores, hyphes, vésicules, fragments de racines mycorhizées.

In fine, l'invention vise à améliorer les méthodes de mycorhization des plantes, notamment des plantes d'intérêt agronomique et/ou forestier, pour une culture intensive plus respectueuse de l'environnement.

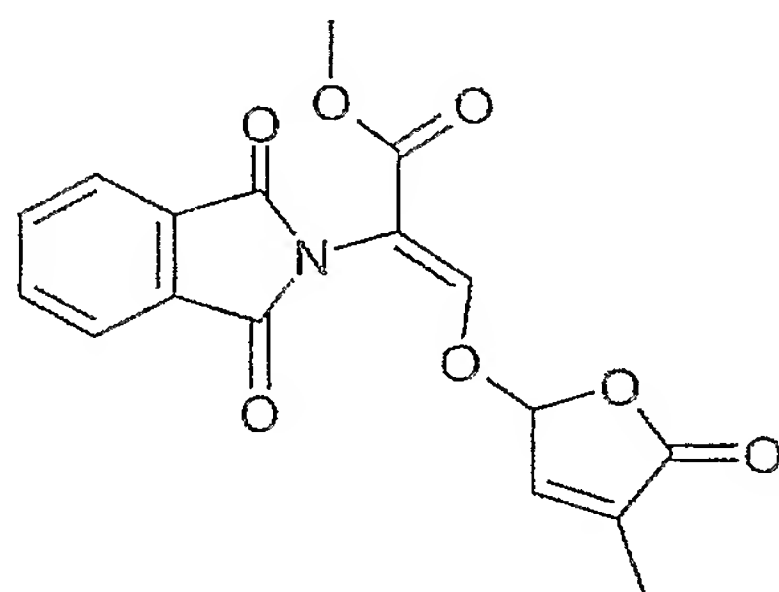
Ainsi, l'invention concerne un procédé de traitement de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, -notamment sous forme de spores- dans lequel on place au contact des champignons MA, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :



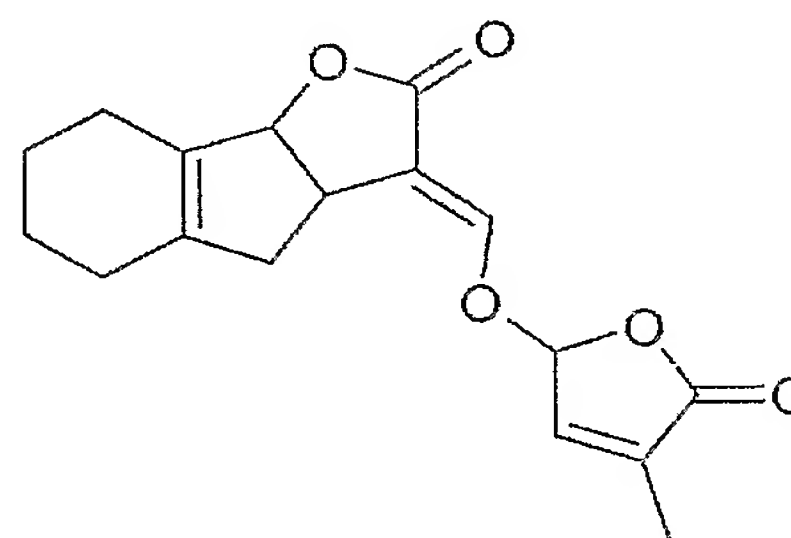
GR24 (Mangnus et *al.*,
J. Agric. Food Chem., 1992,
40(6):697-700)



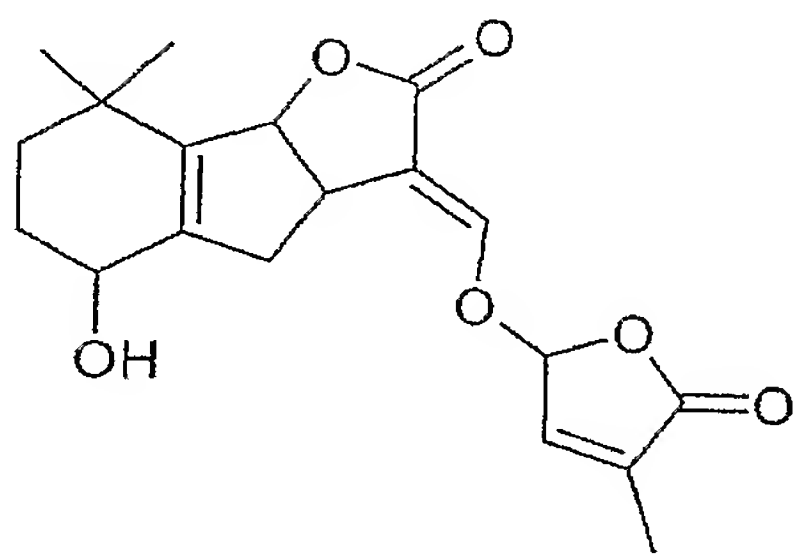
GR7 (Johnson et *al.*, Weed Res., 1976,
16:223-227)



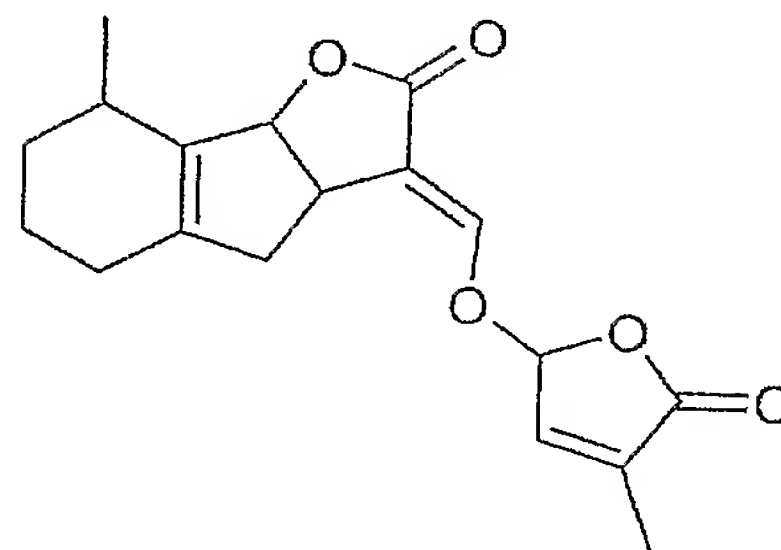
Nijmegen 1 (Nefkens et *al.*,
J. Agric. Food Chem., 1997,
45(6):2273-2277)



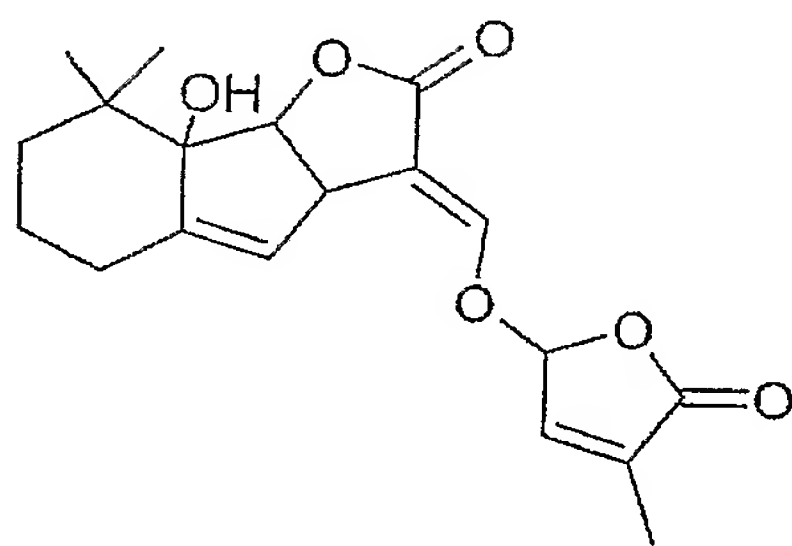
Déméthylsorgolactone (Thuring et *al.*,
J. Agric. Food Chem., 1997, 45(6):2278-
2283)



Strigol (Cook et *al.*, Science, 1966, 1954:1189-1190 ;)

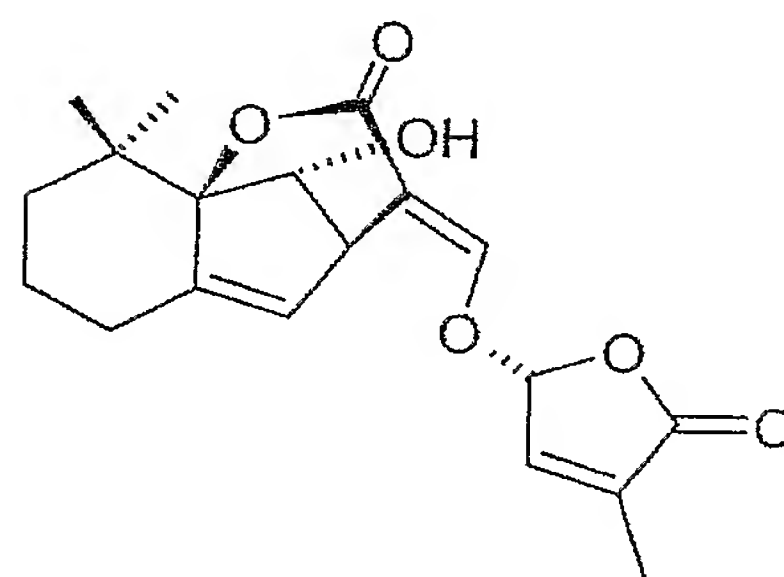


Sorgolactone (Hauck et *al.*, J. Plant Physiol., 1992, 139:474)

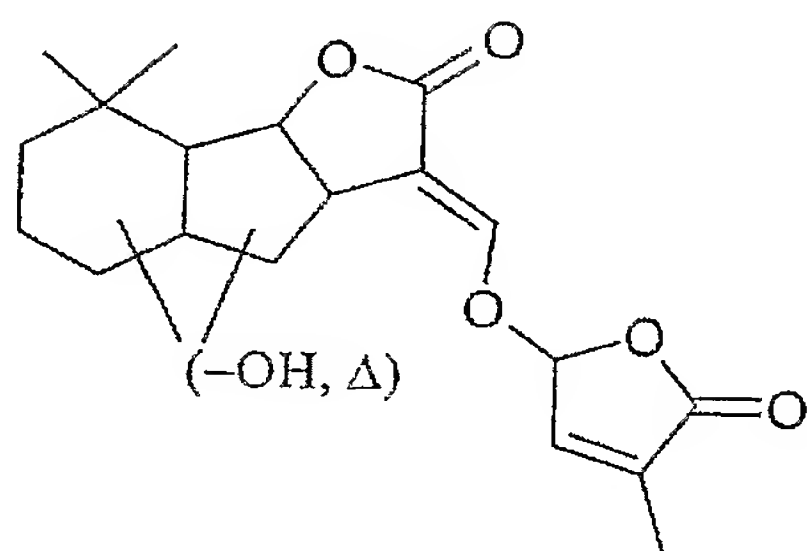


Alectrol

(Müller et *al.*, J. Plant Physiol., 1992, 11:77)



(Wigchert et *al.*, J. Agric. Food Chem., 1999, 47:1705-1710)



Orobanchol (Yokota et *al.*, Phytochemistry, 1998, 49(7):1967-1973)

15 L'invention repose ainsi sur l'identification de composés de
structure définie, ayant la capacité de stimuler la croissance et le développement
des champignons mycorhiziens à arbuscules. En particulier, les travaux menés
par les inventeurs ont effectivement révélé que des molécules déjà connues, GR7
et GR24, des analogues de synthèse de composés naturels appartenant à la
20 famille des strigolactones, pouvaient avantageusement être utilisées à d'autres
fins que l'élimination de plantes parasites.

En effet, les strigolactones (comme le strigol, l'alectrol, la
sorgolactone, l'orobanchol), composés naturels extraits d'exsudats racinaires de
différentes espèces végétales ont été initialement décrites comme des inducteurs

de la germination des graines de plantes parasites des groupes *Striga* et *Orobanche* (Cook et al., Science, 1966, 154:1189-1190 ; Cook et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94:6198-6911) particulièrement néfastes pour certaines cultures d'intérêt économique majeur comme celles du sorgho, du maïs, de la canne à sucre, des fèves... Avec les strigolactones, la germination suicide, une nouvelle approche dans la lutte contre les plantes parasites a pu être envisagée.

Concrétisée avec l'émergence d'analogues de synthèse, comme GR7 et GR24, plus faciles à obtenir que les composés naturels et donc plus propices à une application à échelle industrielle, la germination suicide consiste en un traitement des sols agricoles, susceptibles d'être infestés de plantes parasites, par des analogues de synthèse de strigolactones et ce, au moment où la plante à cultiver ne pousse pas encore dans lesdits sols. En disséminant lesdits analogues de synthèse, on provoque la germination des graines dormantes des plantes parasites lesquelles, n'ayant pas de plante hôte à infester, finissent par mourir par manque de nutrition (Jonhson et al., Weed Research, 1996, 16:223-227).

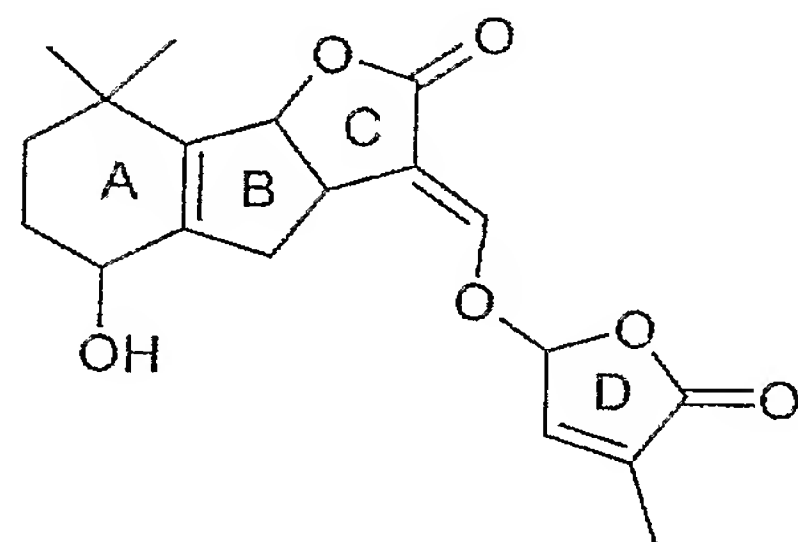
Alors que GR7 et GR24 étaient jusqu'à présent consacrés spécifiquement et uniquement à la germination suicide des graines de plantes parasites appartenant aux groupes *Striga* et *Orobanche*, l'invention propose une exploitation, jusqu'alors impensable, de ces molécules pour leur effet biologique inattendu sur les champignons MA, des micro-organismes de phylogénie très éloignée de celle des plantes *Striga* et *Orobanche*.

De manière jusqu'alors insoupçonnée, les inventeurs ont constaté que GR7 et GR24 entraînent une stimulation de la respiration cellulaire des spores des champignons MA et permettent d'amplifier le processus biologique de la ramification des hyphes de ces champignons. En traitant les spores par GR7 et/ou GR24, les inventeurs sont ainsi parvenus à stimuler la croissance et la ramification des champignons MA. Ces deux réponses physiologiques et morphologiques sont essentielles à l'établissement de l'interaction symbiotique entre les champignons MA et leurs plantes hôtes.

L'invention repose ainsi sur le principe que des molécules de structure et de configuration particulières, notamment les molécules connues sous les appellations usuelles de GR7 et GR24, peuvent être utilisées à titre de facteurs de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA.

Le choix du facteur de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA pour la mise en oeuvre d'un procédé de traitement de champignons MA -notamment sous forme de spores- conforme à l'invention, ne se limite pas seulement à GR7 et GR24. Ce choix s'étend également aux strigolactones en général et, en particulier, au strigol, à l'alectrol, à la sorgolactone et à l'orobanchol.

De même, et selon toute vraisemblance, l'effet recherché avec GR7 et GR24, mais également avec les strigolactones en général, sur les champignons MA vient de la structure et de la configuration particulières des cycles référencés B, C, et D de ces molécules, comme ci-après indiqués avec la molécule de strigol.



Aussi, les travaux des inventeurs montrent que tout composé de structure analogue à GR7, GR24 et aux strigolactones, c'est-à-dire tout composé reprenant la structure de l'enchaînement des cycles référencés B, C, et D des strigolactones (comme par exemple la déméthylsorgolactone) ou simplement leur configuration (comme par exemple le Nijmegen-1, un autre analogue de synthèse des strigolactones), peut être utilisé comme agent stimulateur du développement et/ou de la croissance des champignons MA, conformément à l'invention.

Avantageusement et selon l'invention, le traitement des champignons MA, ou inoculum de champignons MA, est réalisé de préférence sur des spores ou des fragments de racines mycorhizées.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise ledit
5 traitement en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

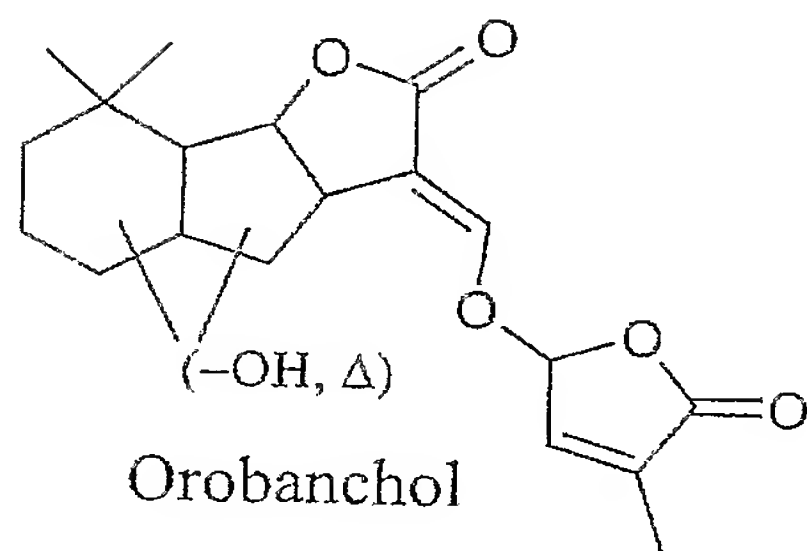
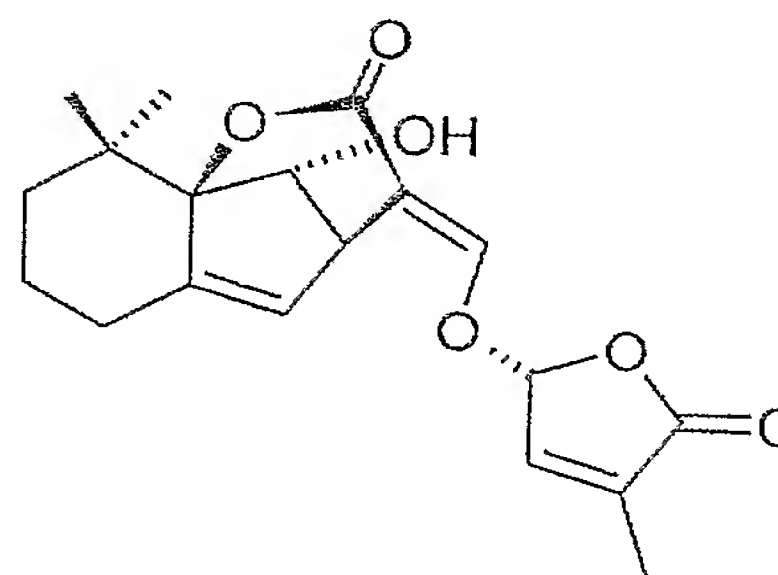
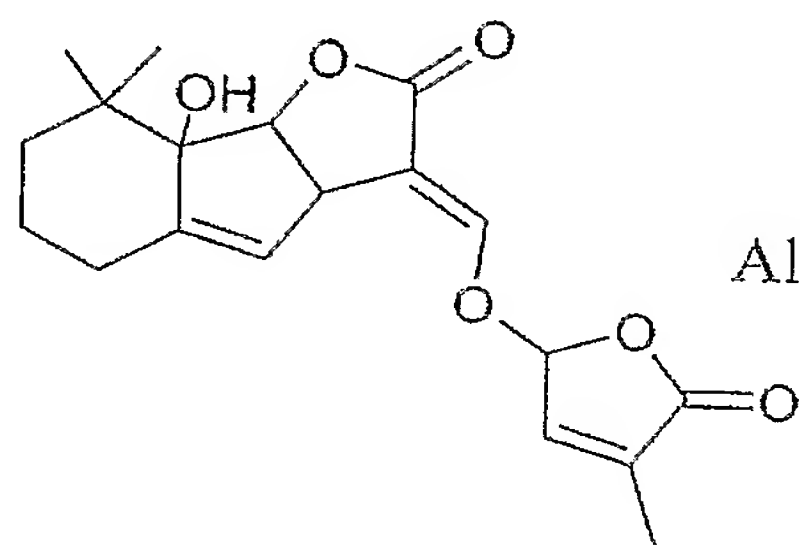
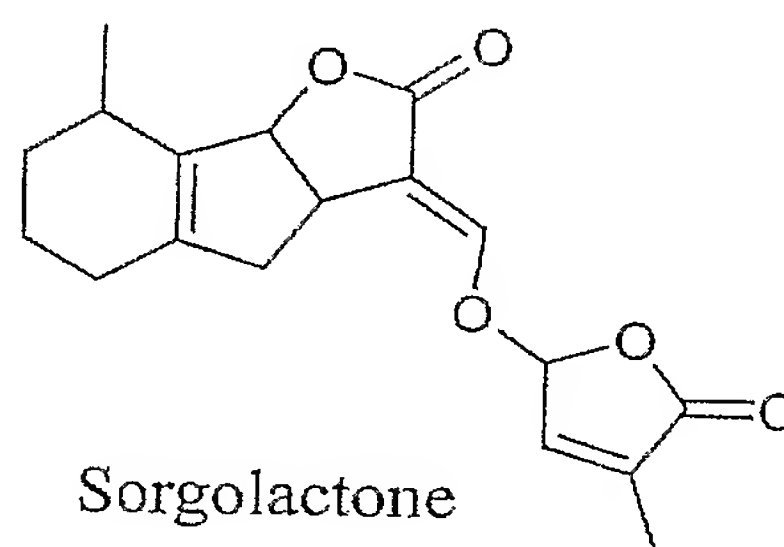
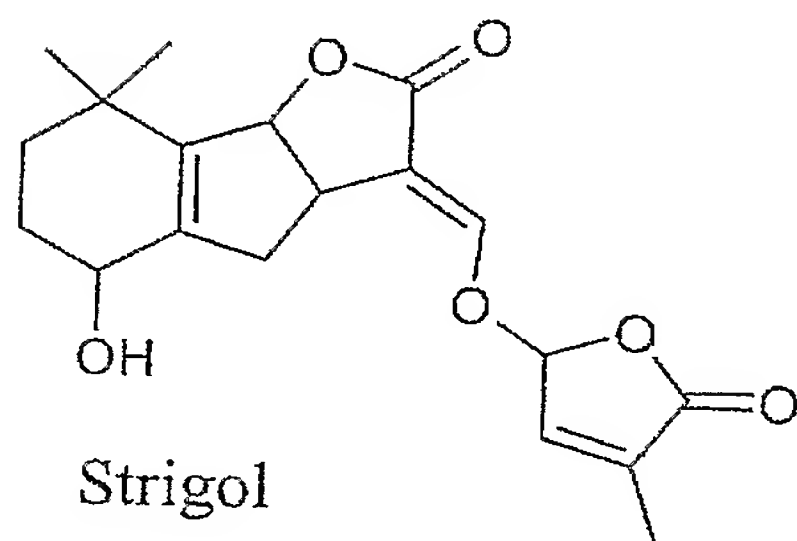
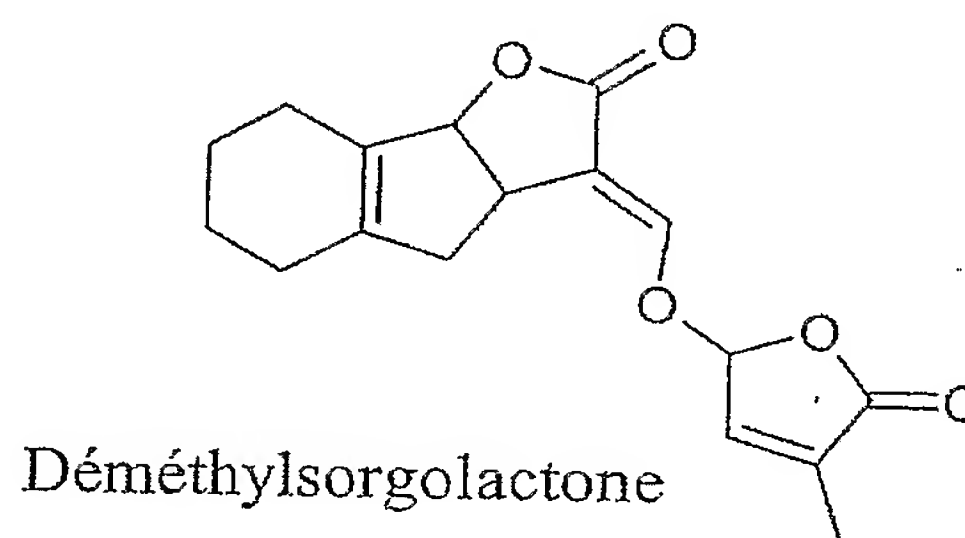
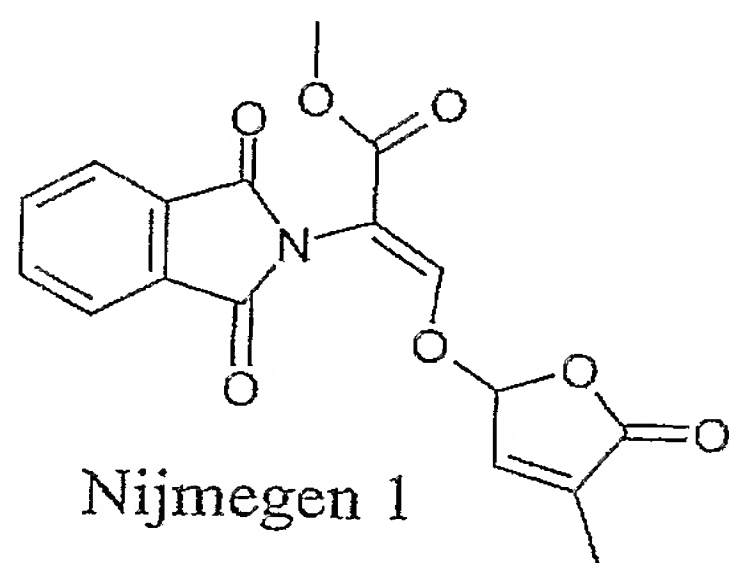
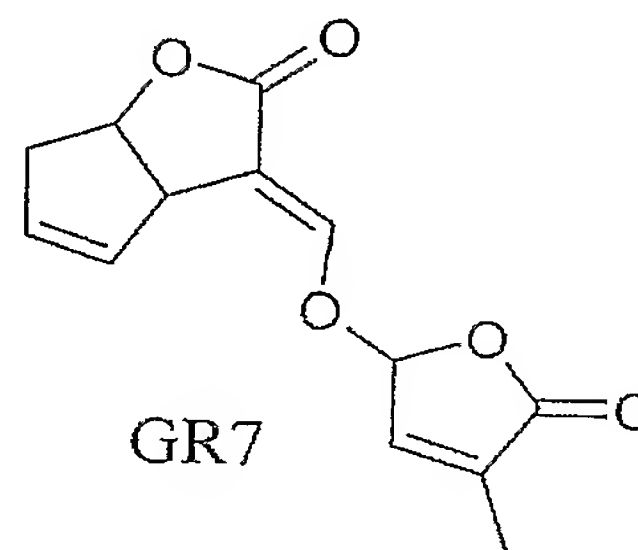
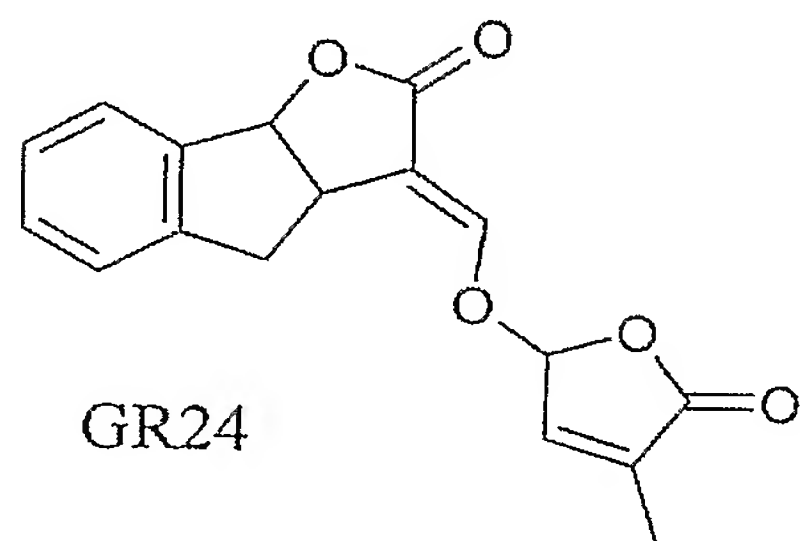
Selon un mode particulier de mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, le traitement des champignons MA -notamment sous forme de
10 spores ou de fragments de racines mycorhizées- est réalisé en milieu aseptique *in vitro*.

Selon un autre mode de mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, le traitement est avantageusement réalisé sur des cultures de plantes hôtes entières cultivées en pot. Mais, on peut aussi envisager de mettre en oeuvre
15 l'invention à plus grand échelle, notamment sur des plantes hôtes entières cultivées en champ. On utilisera alors préférentiellement des composés de synthèse chimique, comme GR7 et GR24, qui présentent l'avantage, en comparaison avec les strigolactones, de pouvoir être disponibles en quantité suffisante et adaptée pour une application industrielle. Certains de ces composés,
20 comme GR7 et GR24, sont déjà disponibles dans le commerce et/ou peuvent être synthétisés selon des protocoles déjà connus (Mangnus et *al.*, J. Agric. Food Chem., 1992, 40(6):697-700 ; Mangnus et *al.*, J. Agric. Food Chem., 1992, 40(7):1230-1235 ; Thuring et *al.*, J. Agric. Food Chem., 1997, 45(6):2278-2283).

Avantageusement et selon l'invention, on utilise des
25 champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

L'invention s'étend aussi à un procédé pour produire de l'inoculum de champignons MA. A cet effet, on réalise une co-culture de champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante
30 apte à former une symbiose avec des champignons MA.

Par ailleurs et selon l'invention, on place également au contact de ladite co-culture, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :



5

10

Avantageusement et selon l'invention, les champignons MA de ladite co-culture sont traités par un procédé de traitement de champignons MA -notamment sous forme de spores- conforme à au moins un des modes opératoires précédemment décrits.

5 De manière plus générale, l'invention peut avantageusement s'inscrire dans le cadre des problématiques de recherche visant à potentialiser la richesse minérale et hydrique naturelle des sols cultivables, essentiellement pour réduire l'usage habituel d'engrais chimiques, souvent sources de pollution par les phosphates et les nitrates.

10 L'invention, par la mise en évidence de facteurs dont certains sont déjà disponibles dans le commerce et capables de stimuler le développement et/ou la croissance des champignons MA, rend ainsi possible la mise en oeuvre, avantageusement à grande échelle, notamment à échelle industrielle, des techniques de mycorhization imaginées il y a plusieurs années
15 mais dont l'application a été, jusqu'à présent, limitée par la faible disponibilité des spores et des autres formes d'inoculum de champignons MA, et par une méconnaissance de facteurs stimulant efficaces et facilement accessibles.

L'invention porte ainsi également sur un procédé de culture d'une plante hôte -en particulier, d'intérêt agronomique ou forestier- apte à former
20 une symbiose avec des champignons MA. Pour ce faire, on réalise dans le milieu de culture un apport d'au moins un agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et leurs analogues structuraux.

25 Selon l'invention, l'apport de l'agent de stimulation est réalisé lors du semis des graines de la plante hôte à cultiver et/ou ultérieurement audit semis.

Dans le cas de la transplantation en terre de jeunes plantes préalablement obtenues (par exemple, par bouturage, microbouturage,
30 marcottage, multiplication *in vitro*,...), l'apport de l'agent de stimulation au milieu de culture (sol de culture) est réalisé lors de ladite transplantation.

Avantageusement et selon l'invention, la plante hôte est cultivée en champ. Elle peut également être cultivée sous serre.

Lorsque la plante hôte est cultivée en champ, il se peut très bien que le sol utilisé contienne naturellement des champignons MA en quantité
5 suffisante. Il n'est alors pas nécessaire de supplémenter d'avantage le champ en ces micro-organismes. Toutefois, il peut s'avérer qu'une telle supplémentation soit nécessaire, sous forme de spores ou autre forme d'inoculum de champignons MA.

Avantageusement et selon l'invention, on supplémente le
10 sol en inoculum de champignons MA, notamment lors du semis, et/ou on procède à un apport répété d'agents de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA -notamment jusqu'à la récolte-.

Avantageusement et selon l'invention, pour la mise en culture, on utilise des semences de la plante hôte, encapsulées avec les agents
15 de stimulation précédemment évoqués, au moyen d'un enrobage en un matériau adapté pour permettre le développement de plantules de ladite plante hôte et la libération desdits agents de stimulation, essentiellement lors des premiers arrosages.

L'invention s'étend à une composition comprenant en
20 combinaison, une quantité de semence d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et des analogues structuraux de ceux-ci.

Avantageusement et selon l'invention, ladite composition
25 est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant, notamment l'eau.

Avantageusement, une composition selon l'invention comprend également une quantité de champignons MA, en particulier sous forme
30 de spores -notamment de *Glomus intraradices* ou de *Gigaspora rosea*-.

L'invention porte également sur une composition comprenant en combinaison une quantité d'inoculum de champignons MA, en particulier des spores, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et des analogues structuraux de ceux-ci.

Avantageusement et selon l'invention, ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant, notamment l'eau.

L'invention concerne aussi un procédé de traitement de champignons MA, un procédé pour produire de l'inoculum de champignons MA, un procédé de culture d'une plante hôte ainsi qu'une composition, caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques ci-dessus et ci-après.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention pourront également apparaître à la lecture de la description des analyses expérimentales suivantes.

Analyse 1 : Effet de GR24 sur l'activation de la respiration cellulaire de *Glomus intraradices*.

Des mesures polarographiques de la consommation d'oxygène ont été effectuées sur des spores de *Glomus intraradices* en germination, en présence ou non de GR24.

Pour ce faire, des spores de *Glomus intraradices* sont mises à germer dans du milieu minimum liquide, dit milieu M (le Tableau 1, ci-après, en présente la composition), pendant une semaine, à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. Par essai, on utilise 400 spores dans 1 ml de milieu M.

Pour la stimulation des spores, on ajoute à chaque essai 10 µl d'une solution de GR24 à 30 µM dans l'acétone (1 %), soit une concentration finale en GR24 de 0,3 µM. Les témoins reçoivent 10 µl d'acétone (1 %).

La consommation en oxygène est mesurée en utilisant une électrode à oxygène, dite électrode de Clark (Hansatech Ltd, Hardwick Industrial, Norfolk, Royaume-Uni), insérée dans une chambre en Plexiglas. L'électrode à oxygène est connectée à un enregistreur calibré entre 0 et 100 %
5 avec l'oxygène atmosphérique.

Les spores sont installées dans la chambre et la température est maintenue à 30°C au moyen d'un bain d'eau circulant. Les taux de consommation en oxygène sont lus directement sur l'enregistreur. Les mesures de consommation d'oxygène se font sur 15 minutes, après 4h (série 1) et 5h30 (série
10 2) de stimulation.

CONSTITUANTS	Concentration finale (mg.l ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	731
KNO ₃	80
KCl	65
KH ₂ PO ₄	4,8
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	288
NaFe-EDTA	8
KI	0,75
MnCl ₂ .4H ₂ O	6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,65
H ₃ BO ₃	1,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,13
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0024
Glycine	3
Thiamine-HCl	0,1
Pyridoxine	0,1
Acide nicotinique	0,5
Myoinositol	50
Milieu complémenté en saccharose	10 g.l ⁻¹

Tableau 1

Deux séries d'expérience indépendantes ont été réalisées. Pour chacune, les valeurs rapportées correspondent à la moyennes de 3 essais. Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau 2 ci-après.

L'augmentation de la consommation en oxygène est exprimée en pourcentage par rapport à celle du témoin, traité à l'acétone.

	% de stimulation (moyenne sur 3 essais)
Série 1	29,0
Série 2	76,6

Tableau 2

5 Analyse 2 : Effet de GR7 sur l'activation de la respiration cellulaire de *Gigaspora rosea*.

Les expériences réalisées à l'oxygraphe dans les mêmes conditions qu'avec GR24 montrent que GR7 est actif sur la respiration de *Gigaspora rosea* à 0,1 μ M final, après 5 heures de stimulation.

10 Le témoin est réalisé avec 10 μ l de méthanol/eau (v/v) par ml de milieu.

Deux séries d'expérience indépendantes ont été réalisées, après 4h (série 1) et 5h30 (série 2) de stimulation.

Pour chacune, les valeurs rapportées correspondent à la moyennes de 3 essais. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3 ci-
15 après.

	% de stimulation (moyenne sur 3 essais)
Série 1	24,0
Série 2	33,6

Tableau 3

20 Analyse 3 : Effet de GR24 sur la stimulation de la ramification des hyphes de *Gigaspora rosea*.

La ramification stimulée des hyphes (apparition de nouveaux apex) est le test couramment employé pour évaluer l'activité stimulatrice de différents effecteurs sur les champignons endomycorhiziens du
25 genre *Gigaspora*. Ce phénomène se produit naturellement à proximité des racines de plantes hôtes, ainsi que sous l'action des exsudats racinaires, et est considéré comme une phase préparatoire à la mise en place de la symbiose (Buée et al., Molecular Plant-Microbe Interaction, 2000, 13:693-698). Cette augmentation de ramification résulte d'une stimulation du métabolisme fongique, et conduit à une

augmentation des points de contact entre le champignon et les racines de la plante. Toute augmentation de la ramification des hyphes du champignon augmente la mycorhization.

Des mesures de ramification (exprimées en nombre d'apex
5 apparus après stimulation) des tubes germinatifs de *Gigaspora rosea* ont été réalisées en présence de différentes concentrations de GR24.

Pour ce faire, des spores de *Gigaspora rosea* sont mises à
germer dans du milieu M gélosé (milieu M comprenant 0,4 % (p/v) de Phytigel®
-SIGMA, France-), pendant 5 jours, à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2
10 % en CO₂. 10 µl d'agents à tester (en concentration variant de 10⁻⁸ à 10⁻¹⁵ M) en
solution dans du méthanol 50 % sont alors apportés dans le milieu par adjonction
dans un puits creusé dans la gélose.

Les témoins reçoivent dans les mêmes conditions, le
solvant des molécules à tester (10 µl de méthanol à 50 %).

48 heures après le traitement, les apex formés au-dessus de
la zone de stimulation sont comptabilisés. Deux séries d'expérience avec GR24, à
différentes concentrations, ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans le
Tableau 4 ci-après.

Concentration en GR24 (M)	Nombre de spores traitées	Nombre d'apex néoformés	Apex/spore	Facteur de stimulation
Série 1				
Témoin	2	6	3,0	1,0
10 ⁻¹⁵	4	15	3,8	1,3
10 ⁻¹²	4	36	9,0	3,0
10 ⁻¹⁰	3	45	15,0	5,0
10 ⁻⁸	4	65	16,3	5,4
Série 2				
Témoin	2	7	3,5	1,0
10 ⁻¹⁵	2	17	8,5	2,4
10 ⁻¹²	4	34	8,5	2,4
10 ⁻¹⁰	3	40	13,3	3,8
10 ⁻⁸	1	14	14,0	4,0

Tableau 4

Des doses submicromolaires de GR24 conduisent à une stimulation de la ramification d'un facteur 5. Avec des doses inférieures au picomolaire, on observe encore un effet stimulateur manifeste.

5 Analyse 4 : Effet de GR7 sur la stimulation de la ramification d'hyphe de *Gigaspora rosea*.

Des spores de *Gigaspora rosea* sont mises à germer dans un milieu M gélosé, pendant 5 jours à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. 10 µl de solution d'agents à tester sont alors apportés dans le milieu
10 par adjonction dans un puits creusé dans la gélose, à partir d'une solution de concentration variant de 10⁻⁵ à 10⁻¹¹ M en agent à tester. Les témoins reçoivent dans les mêmes conditions, uniquement le solvant des agents à tester (10 µl de méthanol à 50 %).

Les apex formés sont comptabilisés au terme de 48 heures
15 de traitement. Par ailleurs, l'activité d'élongation est évaluée par mesure du nombre de cm formés avant et après traitement. Deux séries d'expérience, à différentes concentrations de GR7, ont été réalisées. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5 ci-après.

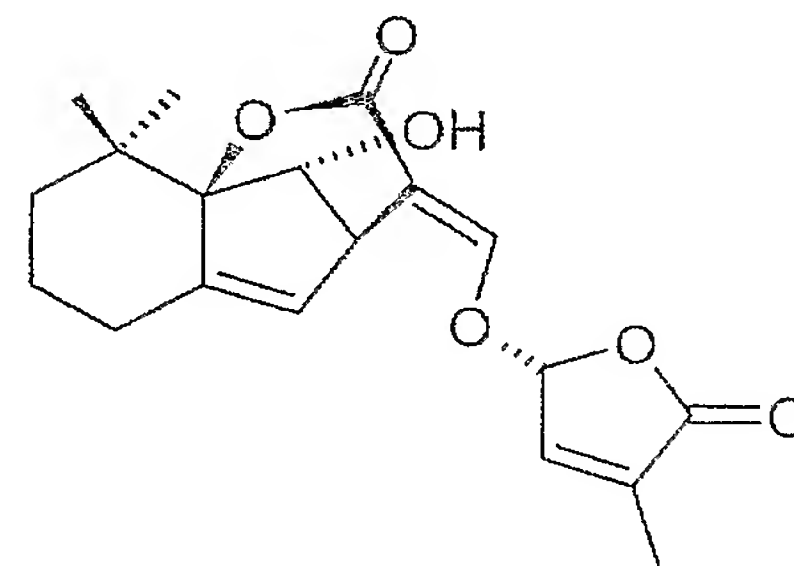
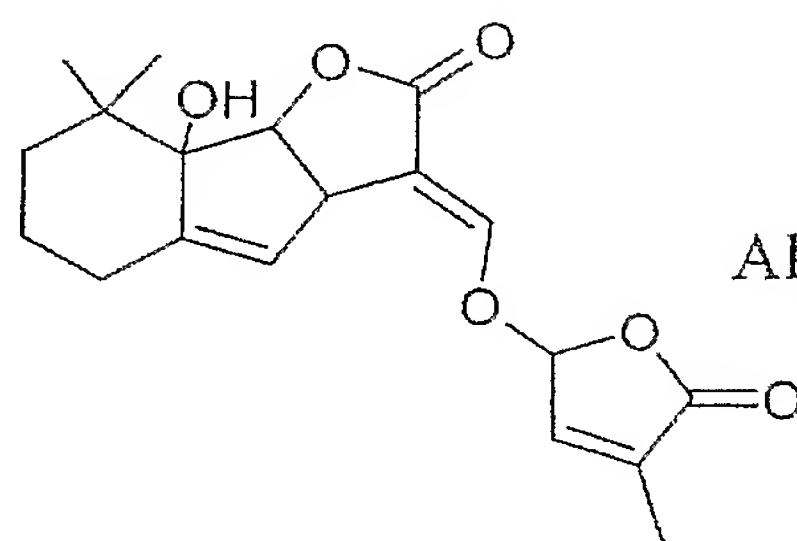
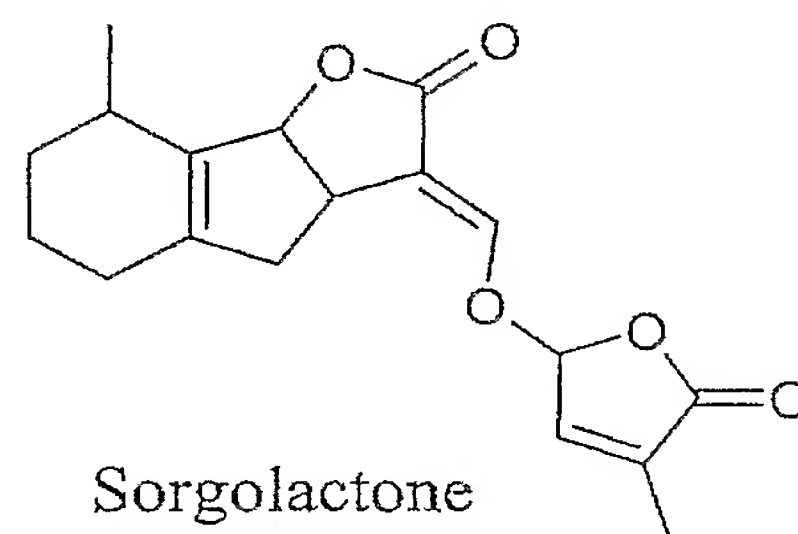
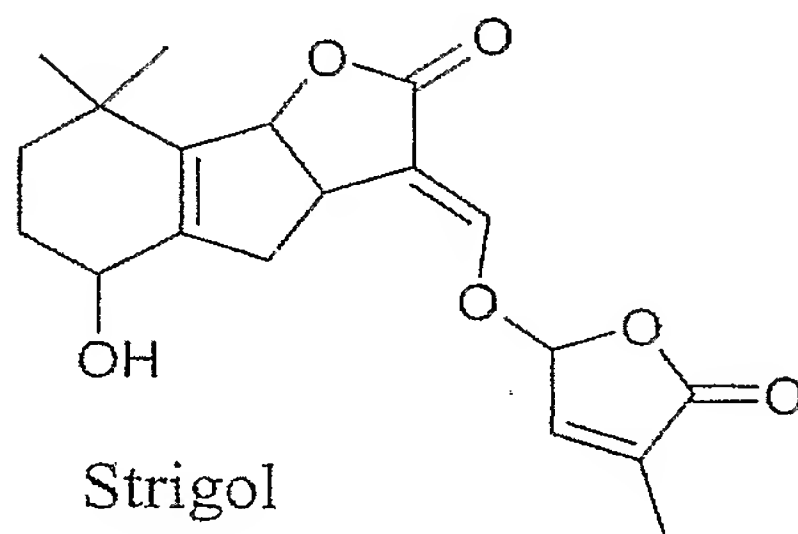
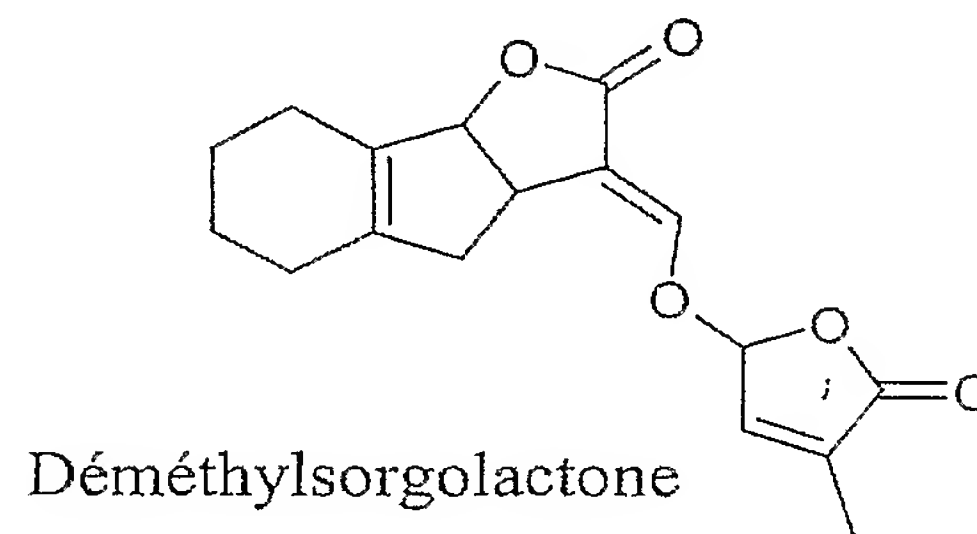
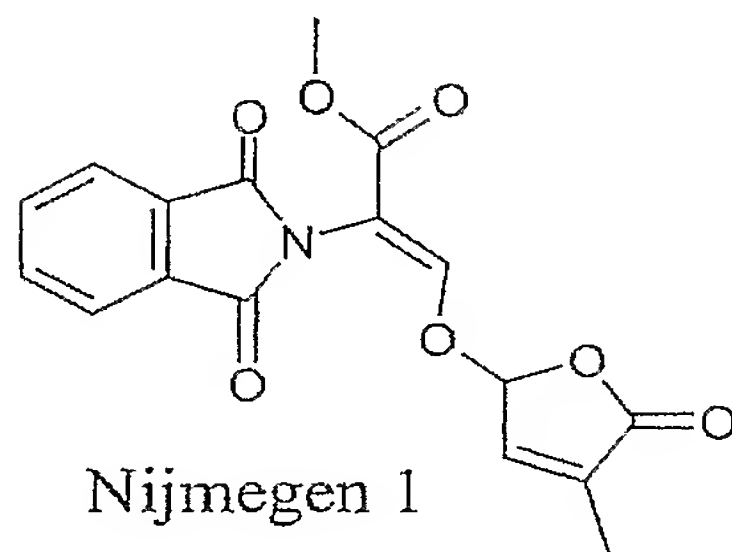
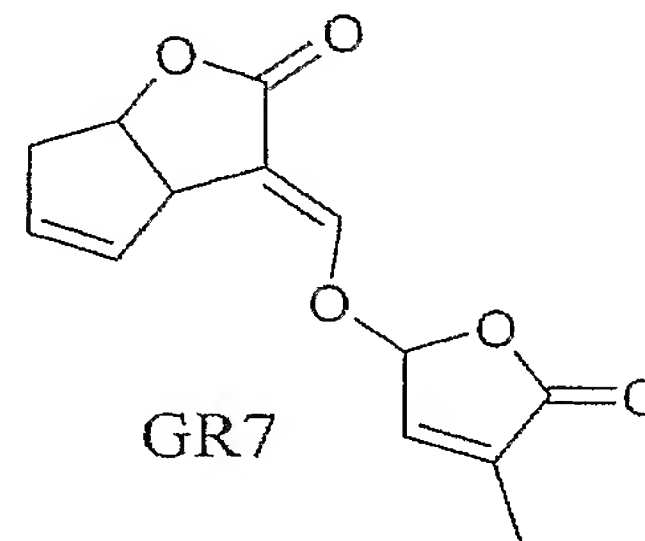
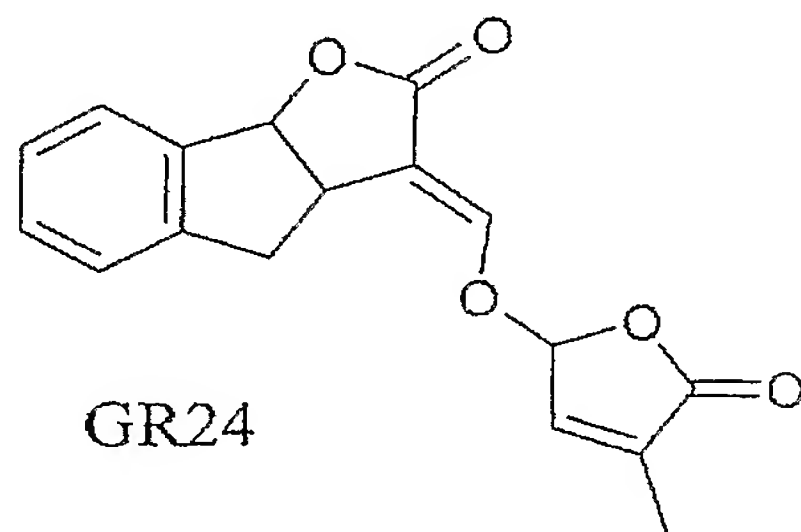
Concentration en GR7 (M)	Nombre de spores traitées	Nombre d'apex néoformés	Rapport de stimulation des ramifications	cm néoformés/spore	Rapport de stimulation de la croissance
Série 1					
Témoin	4	1,75		1,1	1,00
10 ⁻¹¹	6	5,16	2,94	2,65	2,41
10 ⁻⁹	5	8	4,57	2,62	2,38
10 ⁻⁷	4	8,75	5	4,65	4,23
10 ⁻⁵	6	9,3	5,31	4,88	4,44
Série 2					
Témoin	6	2,16		2,49	1,00
10 ⁻¹¹	3	2,66	1,23	2,23	0,89
10 ⁻⁹	6	6,16	2,85	4,99	2,00
10 ⁻⁷	7	10,42	4,82	5,09	2,04
10 ⁻⁵	4	14,25	6,59	6,5	2,60

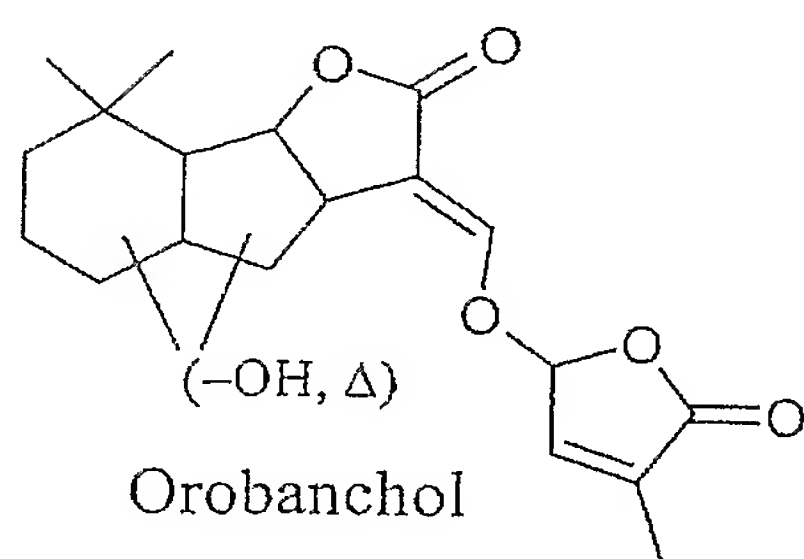
Tableau 5

On constate que des doses de l'ordre du nanomolaire de GR7 sont significativement actives sur la ramification (nombre d'apex nouvellement formées) et sur l'élongation cellulaire.

REVENDICATIONS

- 1/ Procédé de traitement de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on place au contact des champignons MA, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :





2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise ledit procédé sur des champignons MA sous forme de spores.

3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise ledit procédé sur des fragments de racines mycorhizées.

4/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement des champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

5/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement en milieu aseptique *in vitro*.

6/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement sur au moins une plante hôte entière cultivée en pot.

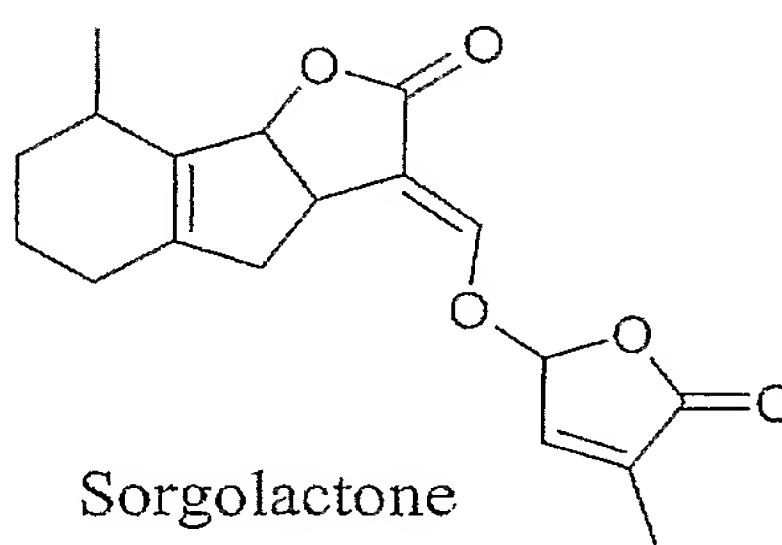
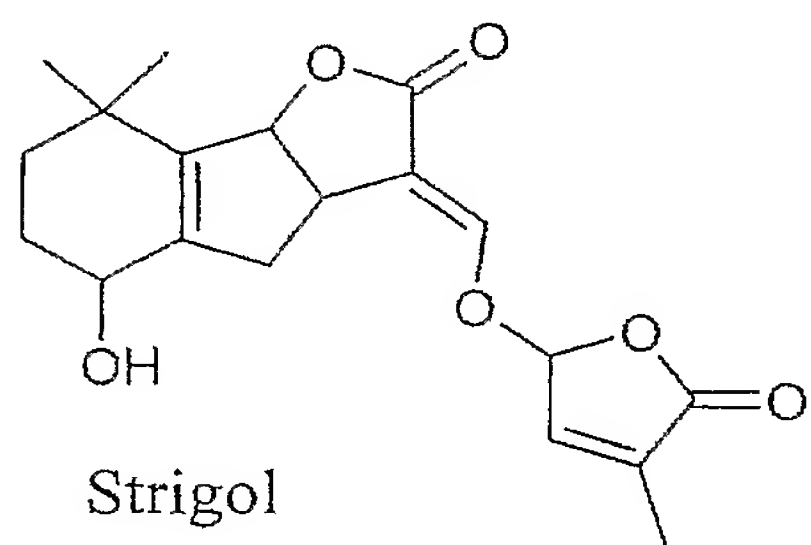
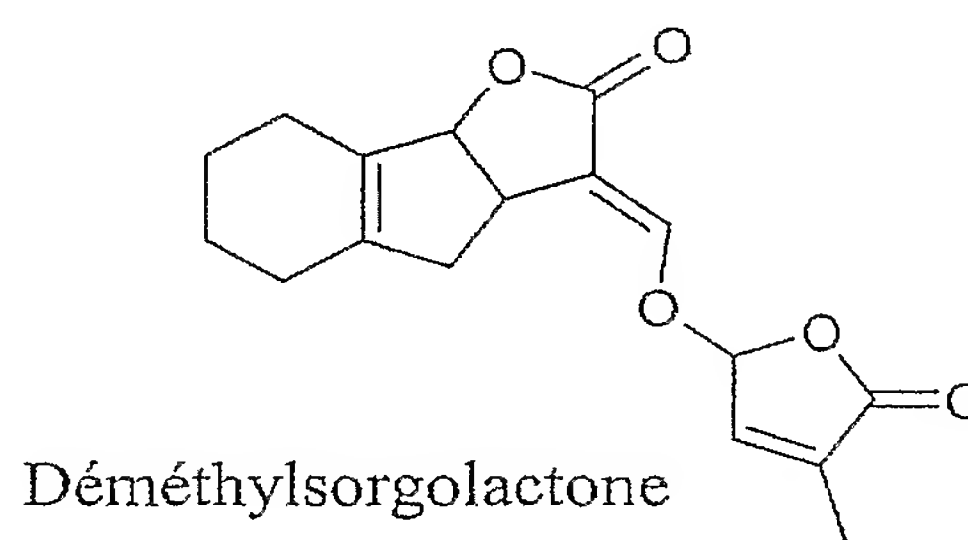
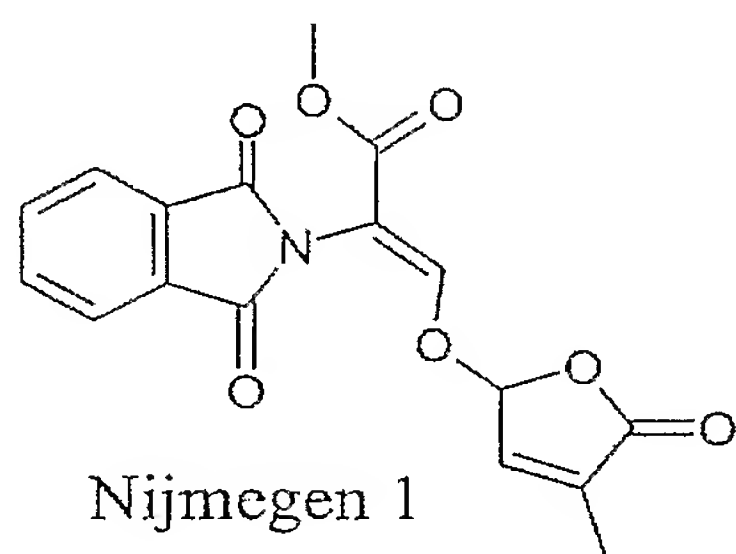
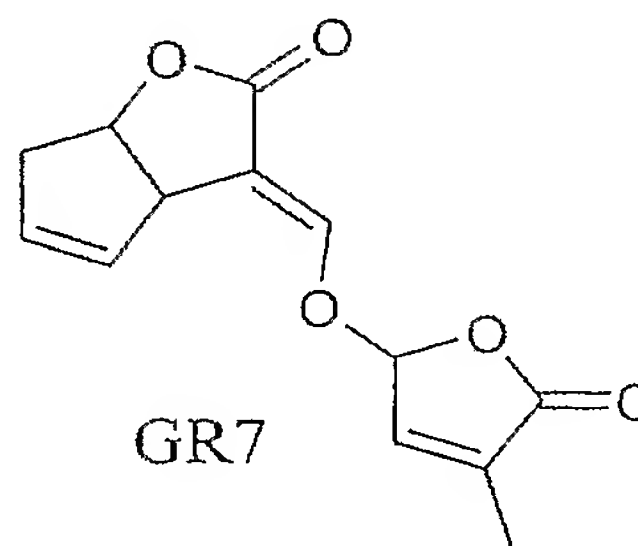
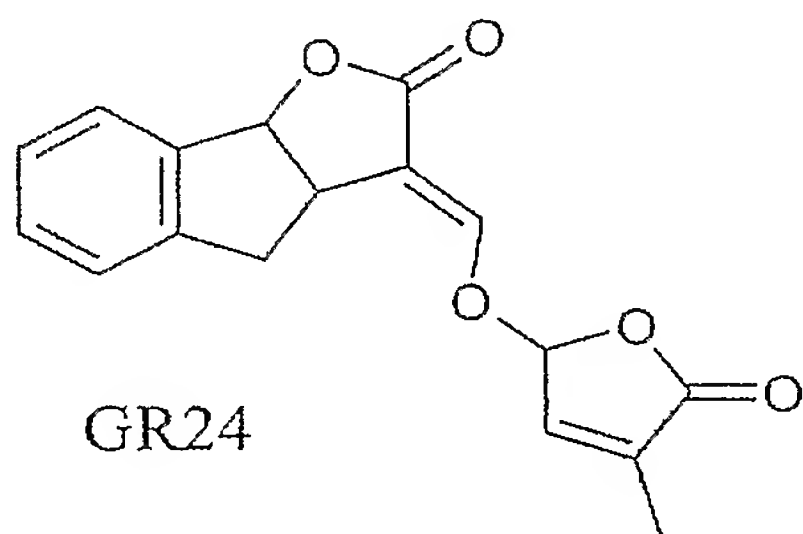
7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement sur au moins une plante hôte entière cultivée en champ.

8/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on utilise des champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

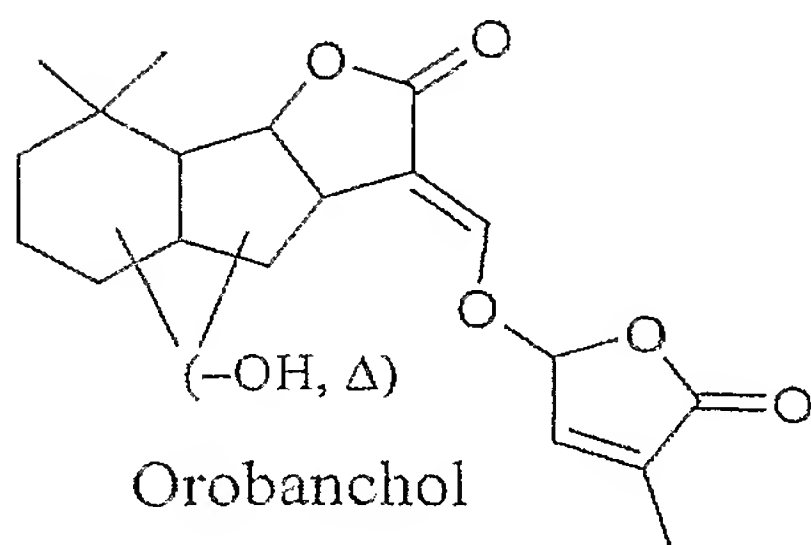
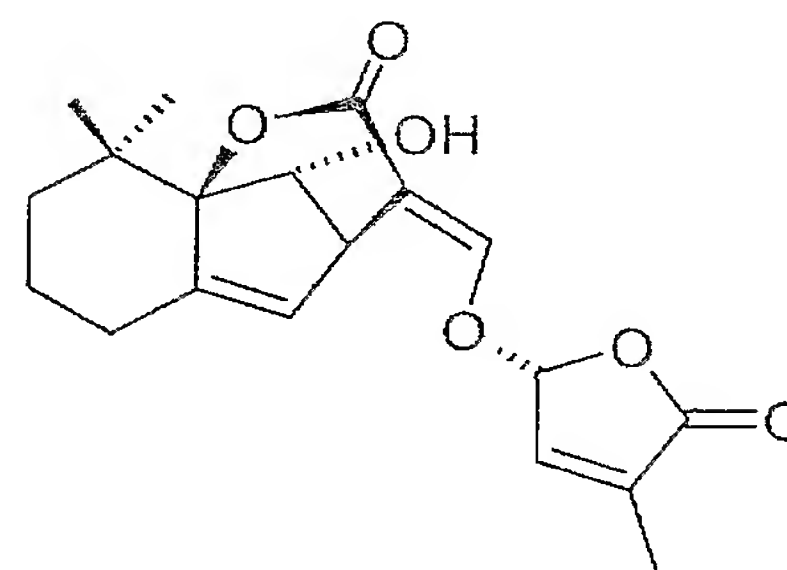
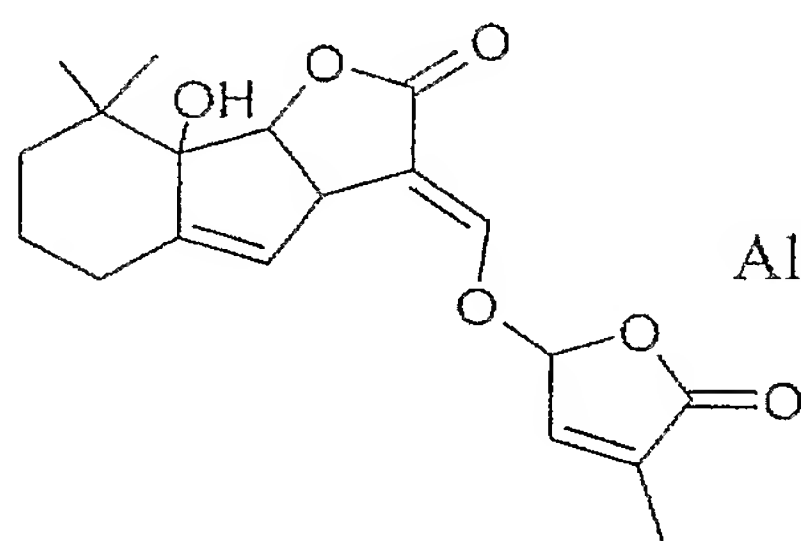
9/ Procédé pour produire de l'inoculum de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on réalise une co-culture de champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA,

caractérisé en ce qu'on place également au contact de ladite co-culture, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :

5

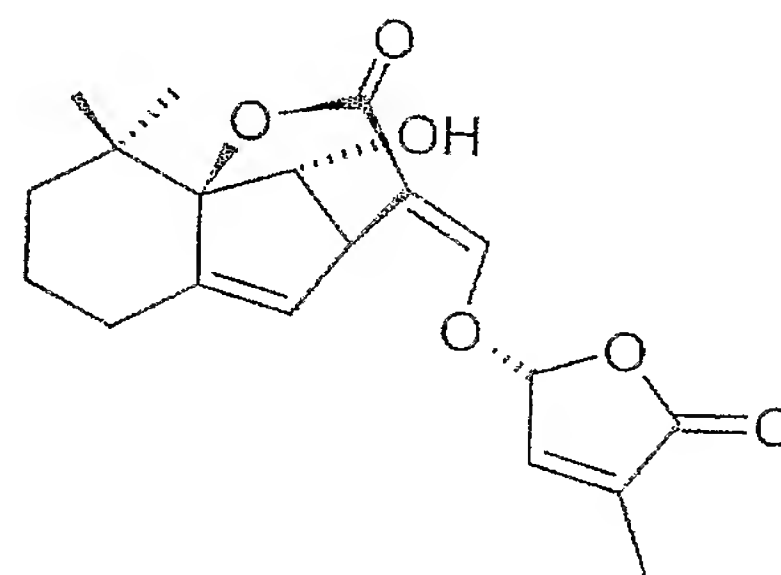
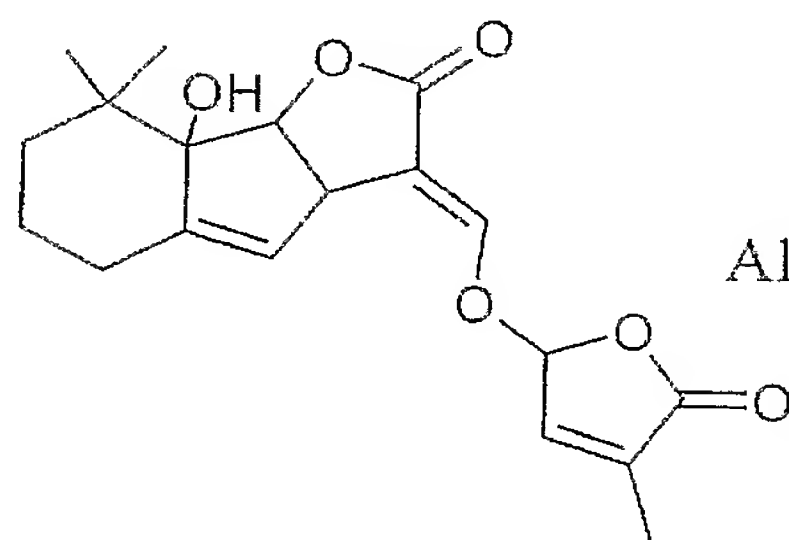
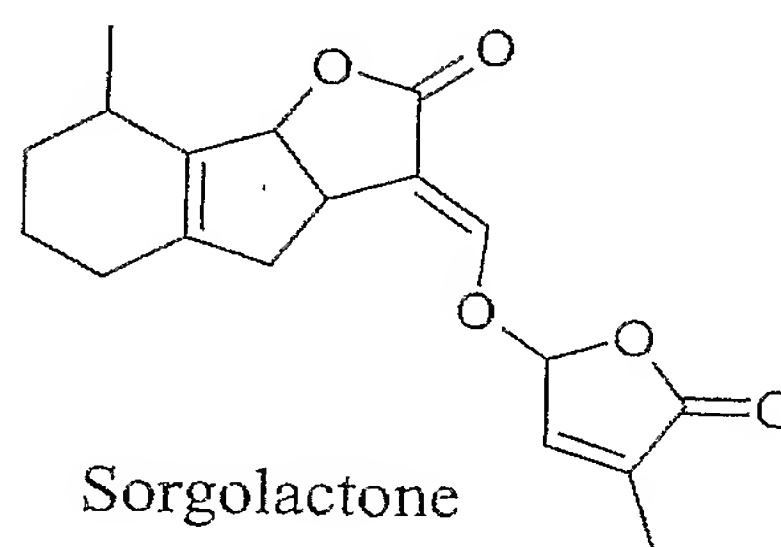
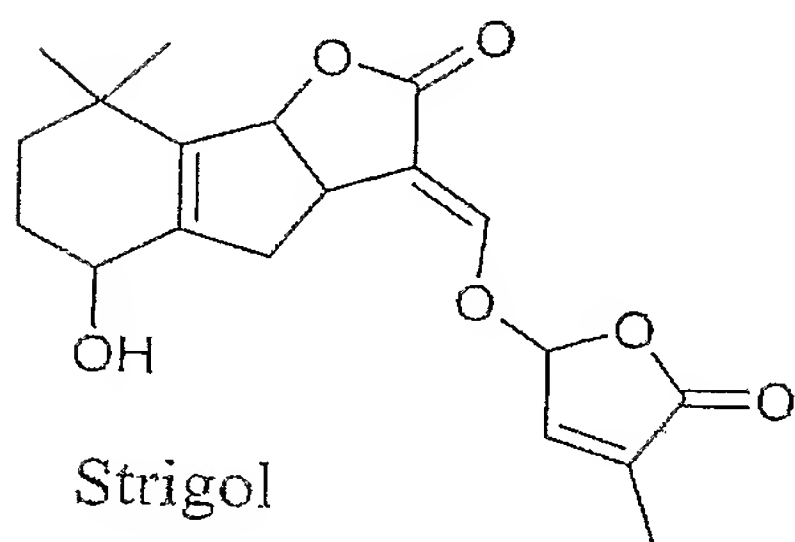
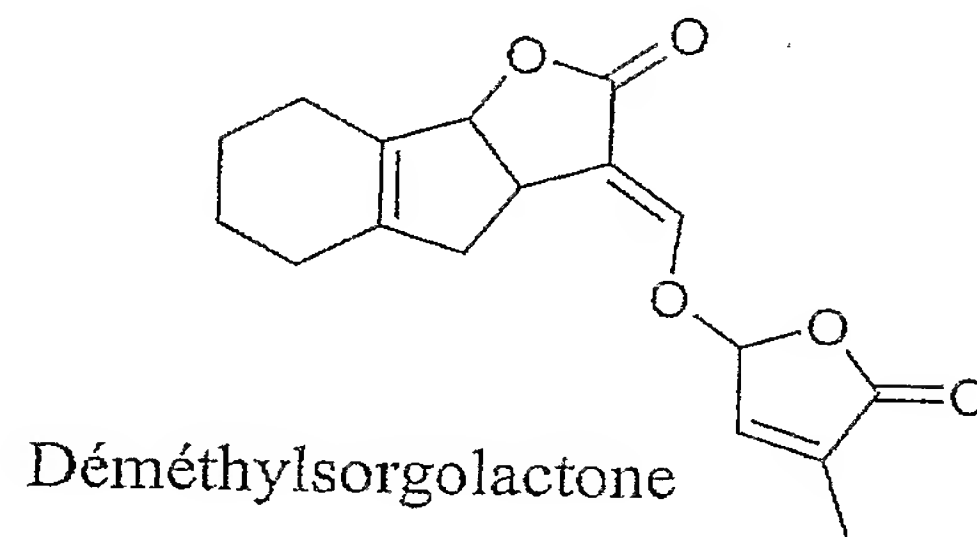
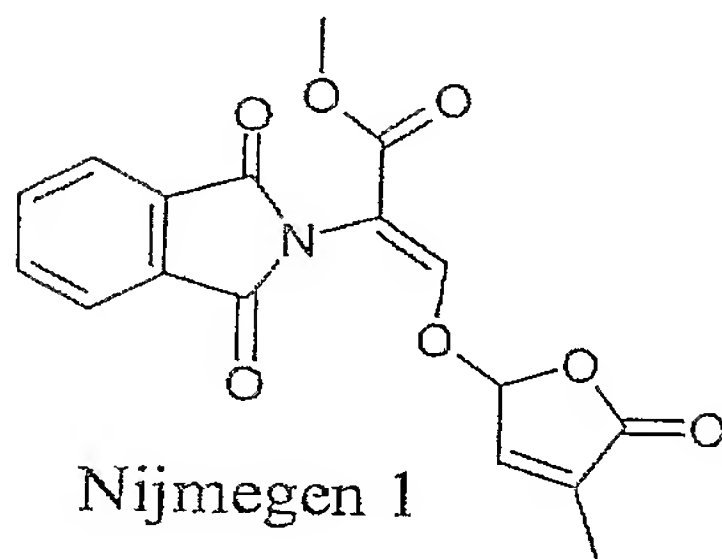
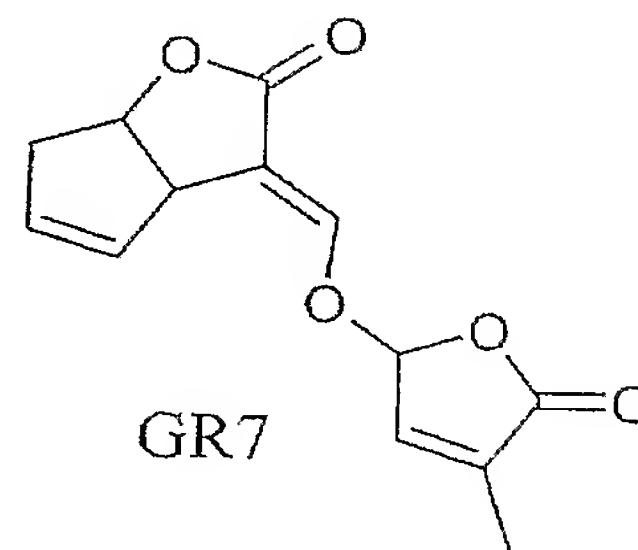
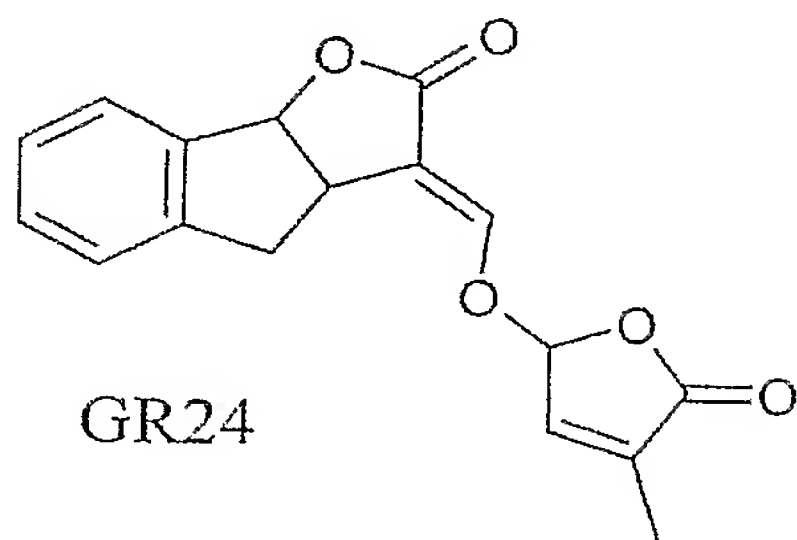


10



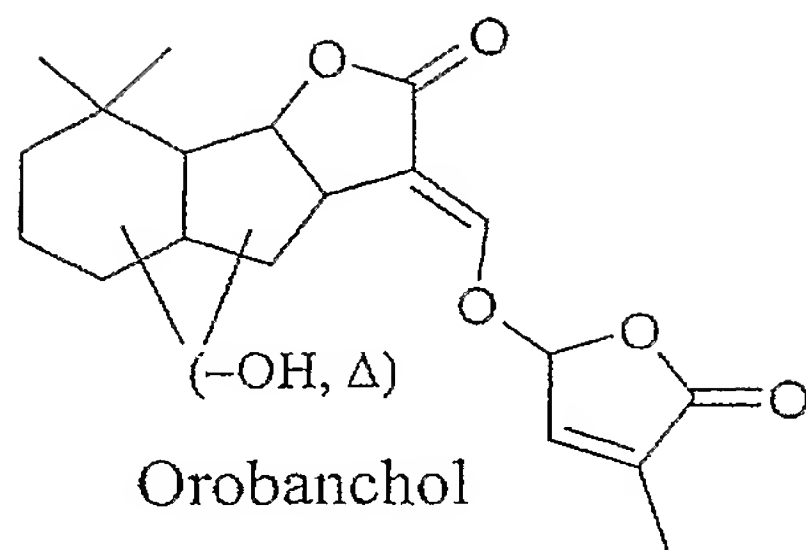
10/ Procédé selon la revendication 9, dans lequel on traite les champignons MA de ladite co-culture par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8.

5 11/ Procédé de culture d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on réalise sur un sol de culture un apport d'au moins un agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi :



10

15



caractérisé en ce que ledit apport de l'agent de stimulation est réalisé lors du semis des graines de la plantes hôte à cultiver et/ou ultérieurement audit semis.

12/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce
5 que la plante hôte est cultivée sous serre.

13/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce
que la plante hôte est cultivée en champ.

14/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce
que lesdits champignons MA sont naturellement présents sur ledit sol de
10 culture.

15/ Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce
qu'on supplémente ledit sol de culture en champignons MA.

16/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 15,
caractérisé en ce qu'on procède à un apport répété d'agents de stimulation du
15 développement et/ou de la croissance desdits champignons MA.

17/ Composition comprenant en combinaison une
quantité de semence d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des
champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou
de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la
20 déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol.

18/ Composition selon la revendication 17, caractérisée
en ce que ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen
d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant.

19/ Composition selon l'une des revendications 17 ou 18,
25 caractérisée en ce qu'elle comprend également une quantité d'inoculum de
champignons MA.

20/ Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'il s'agit d'inoculum de champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

5 21/ Composition comprenant en combinaison, une quantité d'inoculum de champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol.

10 22/ Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce que ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant.

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .1./..2

INV

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

Vos références pour ce dossier (facultatif)

UN643BF10626 K 21

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

0401282

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

MODULATEURS DE DEVELOPPEMENT DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS
A ARBUSCULES, ET APPLICATIONS.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

1/ UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III, Etablissement à caractère scientifique, culturel et professionnel, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE CEDEX 4

2/ CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.), Etablissement public doté de la personnalité civile et de l'autonomie financière,
3 rue Michel-Ange, 75016 PARIS

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BECARD
	Prénoms	Guillaume
Adresse	Rue	13 Lotissement Bel Horizon
	Code postal et ville	31450 ODARS
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROUX
	Prénoms	Christophe
Adresse	Rue	14 rue de la Martinique
	Code postal et ville	31810 LE VERNET
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	SEJALON-DELMAS
	Prénoms	Nathalie
Adresse	Rue	Encartiero
	Code postal et ville	31560 NAILLOUX
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

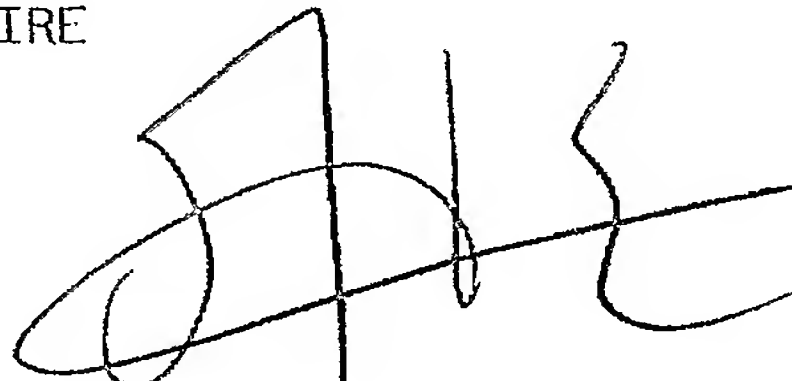
DATE ET SIGNATURE(S) Le 10 février 2004

DU (DES) DEMANDEUR(S) LE MANDATAIRE

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Christian LASSIAILLE
CPI N° 92.1137



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 / ...2

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		UN643BF10626 K21
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0401282
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
MODULATEURS DE DEVELOPPEMENT DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES, ET APPLICATIONS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
1/ UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III; Etablissement à caractère scientifique, culturel et professionnel, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE CEDEX 4		
2/ CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.), Etablissement public doté de la personnalité civile et de l'autonomie financière, 3 rue Michel-Ange, 75016 PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		PUECH
Prénoms		Virginie
Adresse	Rue	Appt 464, 13 rue LA de Bougainville
	Code postal et ville	31400, TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		ROY
Prénoms		Sébastien
Adresse	Rue	2 rue de la Ciotat
	Code postal et ville	31500, TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) Le 10 février 2004 DU (DES) DEMANDEUR(S) LE MANDATAIRE OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Christian LASSIAILLE CPI N° 92.1137		





1. 1. 1.

2. 2. 2.
3. 3. 3.
4. 4. 4.
5. 5. 5.

6. 6.